

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(20)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-230094

⑬ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)9月26日

C 12 P 19/32
// (C 12 P 19/32
C 12 R 1:07)
(C 12 P 19/32
C 12 R 1:15)
(C 12 P 19/32
C 12 R 1:13)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 5'-イノシン酸の製造法

⑯ 特 願 昭62-63385

⑰ 出 願 昭62(1987)3月18日

⑱ 発 明 者 藤 尾 達 郎 神奈川県相模原市相模台6-29-1
⑱ 発 明 者 武 市 康 利 茨城県稲敷郡阿見町阿見4845-4
⑱ 発 明 者 北 辻 桂 東京都町田市成瀬2-9-5 ポブラケ丘コープ14-206
⑱ 発 明 者 飯 田 章 博 東京都町田市森野4-17-9
⑲ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

5'-イノシン酸の製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) イノシンまたはイノシンを生産する能力を有する微生物を培地中に培養して得たイノシン発酵の培養液と、5'-アデノシン-三リン酸(以下ATPと略記する)の前駆体、エネルギー供与体およびリン酸基供与体からATPを生合成する能力を有する微生物の培養液と、イノシンとATPとから5'-イノシン酸とATPの前駆体とを生成する能力を有する微生物の培養液と、もしくはそれら各培養液の処理物とを存在させることにより、5'-イノシン酸を培地もしくは反応液中に蓄積させ、該培養液もしくは反応液から5'-イノシン酸を採取することを特徴とする5'-イノシン酸の製造法。
- (2) ATPの前駆体とエネルギー供与体およびリン酸基供与体とからATPを生合成する能力を

有する微生物として、イノシン生産菌を利用することを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の方法。

- (3) 微生物の処理方法が、有機溶剤および/または界面活性剤を用い、これらを菌体とあらかじめ接触させるか、または培地中もしくは反応液中に存在させる方法であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は5'-イノシン酸(以下「IMP」と略記する)の製造方法に関する。IMPは調味料として用いられ、従って本発明は食品工業の分野に関する。

従来の技術

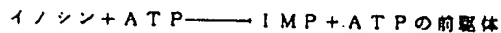
これまでIMPの製造法としては、(1)酵母菌体から抽出したり核酸を酵素的に分解して製造する方法、(2)発酵法によって生産されるイノシンを化学的にリン酸化する方法、(3)IMP生産能を有する微生物を培養し培地中に蓄積され

たIMPを取得する方法、などが知られておりそれぞれ実用化されている。

発明が解決しようとする問題点

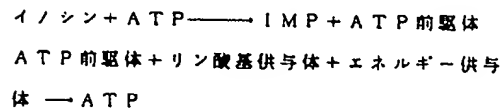
IMPは調味料として一般家庭で用いられているのをはじめ、漬物、竹輪、インスタントラーメン、各種スープ類などの加工食品に広く使われおり、より効率的、経済的な製造方法が望まれている。

イノシンと5'-アデノシン-3-リン酸(以下ATPと略称する)を基質として酵素的にイノシンをIMPにリン酸化する反応は、イノシンキナーゼ[Inosine kinase (EC 2.7.1.73)]に相当する活性により触媒され、次式に示すようにIMPと同時にATPの前駆体を生成する。



経済的に実用性のあるIMP製造法においては、ATPの安価な供給方法が必要である。イノシンのリン酸化反応では、ATPの末端のリン酸基がIMPに取り込まれるのみで、ATPの前駆体部

分はそのまま残る。適当な基質からATP合成に要するエネルギーを獲得し、それによってATPの前駆体からATPを生合成することができる反応系(以下ATP再生系と称することがある)があれば、イノシンリン酸化活性と共役させることによって、次式に示すように、ATPの前駆体相当部分を反復使用し得るIMP生成系、すなわちATPの添加が不要なIMP生産系が構築できる可能性が考えられる。その場合、リン酸基供与体およびエネルギー供給基質が安価なものであれば経済的に有利なIMP生産法になり得ると考えられる。



問題点を解決するための手段

本発明者は、糖質などの炭素源からイノシンを直接発酵生産する能力を有するイノシン生産菌(以下イノシン菌と称することがある)と、ATP

前駆体とエネルギー供与体およびリン酸基供与体とからATPを生合成する活性(以下ATP再生活性と称することがある)を有する微生物(以下ATP再生菌と称することもある)、およびイノシンとATPからIMPおよびATP前駆体を生成する酵素(以下リン酸化酵素と称することもある)または同活性を有する微生物(以下リン酸化菌と称することもある)との共同作用を利用すれば、糖質(グルコースなど)をイノシン生産の主原料とし、またATPの代わりにATPを再生するための安価なエネルギー供給基質およびリン酸基供与体を用いて実用的なIMPの製造ができること、さらにはATP再生系としてイノシン菌が併せ持っているATP再生活性を利用することも可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、発酵法によりイノシンを生産し、引き続きATPをリン酸基供与体とする酵素反応によりイノシンをリン酸化してIMPを製造する方

法に関する。さらに詳細には、イノシン菌の培養液と、ATP再生菌の培養液、およびリン酸化菌の培養液、もしくはそれらの各培養液の処理物とを存在させることにより、IMPを培地中もしくは反応液中に蓄積させ、該培養液もしくは反応液中からIMPを採取することによりIMPを製造する方法に関する。

イノシン菌としては、培養液中にイノシンを蓄積する能力を有する菌株であればいずれでも用いられる。なかでも
プレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 21295、
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 19185、
バチルス・サチルス ATCC 14618、
などが好適である。

これらの菌を通常の培養方法によって培養することによって、培地中にイノシンを蓄積させることができる。すなわち、これらの細菌を適当な炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中において、好気的条件下にて温度、pHなどを調節しつつ培養を行え

ば良い。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で、温度は20~40℃、好ましくは25~35℃において、pHは中性付近に維持しつつ、通常10~120時間行う。

A T P再生菌としては、前記のイノシン生産菌のほか、

エシェリヒア・コリ	C 6 0 0	ATCC33525
エシェリヒア・コリ	B	ATCC11303
スタフィロコッカス・オーレウス		ATCC4012
サッカロミセス・セレビシエー		ATCC20018
キャンディダ・ゼイラノイデス		ATCC20356
トルロブシス・サイクロフィラ		ATCC22163

などを例示することができる。

これらの菌を通常の培養方法によって培養することによって、A T P生成活性を有する培養液、もしくは固体を得ることができる。すなわち、これらの細菌を適当な炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中において、好氣的条件下にて温度、pHなどを調節

しつつ培養を行えば良い。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で、温度は20~50℃、好ましくは25~43℃において、pHは中性付近に維持しつつ、通常10~120時間行う。

リン酸化菌としては、イノシンおよびA T PからI M Pを生成するイノシンリン酸化活性を有する微生物であればいずれでも使用できる。具体的には、

エシェリヒア・コリ	ATCC 39023
エシェリヒア・コリ	ATCC 11303
バチルス・サチルス	ATCC 14617
フラボバクテリウム・デボランス	ATCC 10829
セラチア・マルセッセンスYT101	FFRM 8P-1291

などを例示することができる。また、遺伝子組換えや細胞融合などの分子育種手法によって、これらの微生物のイノシンリン酸化活性を強化した菌株なども好適である。

これらの微生物を通常の培養方法によって培養することによって、イノシンおよびA T Pから

I M Pを生成する強力な活性を有する培養液、固体、またはそれらの処理物を得ることができる。すなわち、これらの微生物を適当な炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中において、好氣的条件下で温度、pHなどを調節しつつ培養を行えば良い。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は20~50℃が良く、28~43℃がより好ましい。培養中の培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養時間は通常1~48時間である。

イノシン菌、A T P再生菌、およびリン酸化菌の培養に用いる炭素源としてはグルコース、フラクトース、シュークロース、マルトース、マンニトール、ソルビトールなどの炭水化物や糖アルコール、グリセロール、さらにビルビン酸、乳酸、クエン酸などの名目のアルコールや有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジンなどの各種アミノ酸などが使用できる。また、澱粉加水分解物、糖蜜、腐植質、白炭、キャッサバ、バガス、コーン

・スティープ・リカーなどの天然有機炭素源も各菌が質化できるものであればいずれでも用い得る。

窒素源としては、アンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニンなどのアミノ酸、あるいはペプトン、N Zアミン、コーン・スティープ・リカー、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、さなぎ加水分解物などの含窒素有機物などの種々の物が使用可能である。さらに、無機物としては、リン酸二水素カリウム、リン酸一水素ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化鉄、硫酸銅、塩化マンガン、モリブデン酸アンモン、硫酸亜鉛などを必要に応じて添加する。微生物の生育に必要なビタミン、アミノ酸、ミネラル、核酸その他のものは必要に応じて添加するが、前記したような他の培地成分に伴って培地に供給されれば特に加えなくても良い。

かくして得られるイノシンを含有するイノシン菌の発酵液、菌体、もしくはそれらの処理物と、ATP再生菌の培養液、菌体、もしくはそれらの処理物と、リン酸化菌の培養液、菌体、もしくはそれらの処理物とを合わせるの、それぞれを別個に培養し培養終了後混合しても良いし、またイノシン発酵の開始時点もしくはそれから終了時点までのいずれかの時点で、ATP再生菌およびリン酸化菌の培養液、菌体、もしくはそれらの処理物を混合しても良く、さらにはリン酸化菌培養の開始時点から培養終了時点までのいずれかの時点においてイノシン菌およびATP再生菌の培養液、菌体もしくはそれらの処理物を混合してもよい。さらに、ATP再生菌の培養開始時点から培養終了までのいずれかの時点に、イノシンを含有する培養液、およびリン酸化菌培養液の、菌体もしくはそれらの処理物を添加しても良い。また、イノシン生産菌とリン酸化菌およびATP再生菌を混合培養し、その培養液もしくは処理物を用いても良い。

必要に応じてATP前駆体を添加しても良い。

イノシンからIMPへのリン酸化は、上記混合液に必要なに応じてマグネシウムイオン、界面活性剤および/または有機溶剤などを加え、pHを6~10、より好ましくは7~8に調整しつつ、かつ20~50℃に1~48時間保ちつつ行わせる。イノシンからIMPへのリン酸化時のイノシンの濃度は、1~100 mg/mlの範囲にあることが望ましい。

イノシンまたはイノシン含有物としては、イノシンの精製品、粗精製品、イノシン発酵液の濃縮物、除菌体上清液およびその濃縮物など、イノシンからIMPへのリン酸化反応を妨げないものであればいずれでも用いることができる。

イノシン菌、ATP再生菌、およびリン酸化菌の各培養液もしくは菌体の処理物としては、培養液の濃縮物および乾燥物、培養物を遠心分離して得られる上清液、菌体、凍結菌体、さらには菌体の乾燥物、凍結乾燥物、アセトン処理物、界面活性剤および/または有機溶剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体などがあげられる。また、ATP

ATP再生系としてイノシン菌の有しているATP再生活性を利用する場合、イノシンおよびイノシン発酵菌体を含む培養液と、リン酸化菌培養液、菌体、もしくはその処理物とを合わせるの、それぞれを別個に培養し培養終了後混合しても良いし、またイノシン発酵の開始時点もしくはそれから終了時点までのいずれかの時点でリン酸化菌培養液、菌体もしくはその処理物を混合しても良く、さらにはリン酸化菌培養の開始時点から培養終了時点までのいずれかの時点においてイノシン発酵液、菌体もしくはそれらの処理物を混合してもよい。また、イノシン生産菌とリン酸化菌とを混合培養し、その培養液もしくは処理物を用いても良い。

かくして得られるイノシンまたはイノシン含有物、イノシン菌培養液もしくは菌体、およびリン酸化菌培養液もしくは菌体を含む液、またはそれらの処理物を含む液を用いて、これとリン酸基供与体およびATP再生基質とを接触させることによってIMPを得ることができる。なお、

再生菌もしくはリン酸化菌の菌体処理物としては、前記の他に、該菌体から抽出したATP再生酵素もしくはリン酸化酵素含有液、それらの酵素の精製製品、固定化物なども用いられる。

ATP再生基質としては、使用するATP再生菌によって利用され得るものであれば、グルコース、アラビノース、ラクトース、マルトース、シュクロース、マンニトール、ソルビトール、トレハロース、糖蜜、廃糖蜜、その他の糖質、澱粉加水分解物などの炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸、 α -ケトグルタル酸などの有機酸、グリシン、アミノ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミンなどのアミノ酸などいずれでも良い。また、アセチルリン酸、カルバミルリン酸、クレアチンリン酸などのリン酸化化合物も用いることができる。

リン酸基供与体としては、オルソリン酸、ピロリン酸、ポリリン酸、ポリメタリン酸などの無機リン酸のナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩などいずれでも使用できる。また、アセチル

リン酸、カルバミルリン酸、クレアチンリン酸、フラクトース-1, 6-ニリン酸などの有機リン酸化化合物も用いることができる。その濃度は、10~400mMの範囲を保つことが望ましい。

ATPの前駆体としては、5'-アデノシン-ニリン酸、5'-アデノシン-ニリン酸、アデノシン、アデニンなどの精製標品、粗精製品、またはそれらの含有物など、イノシンからIMPへのリン酸化反応を阻害しないものであればいずれでも使用できる。なお、固体や培養液などから反応系中に持ち込まれる量が十分であれば、特に添加する必要はない。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製・以下同じ）、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイド、カチオンFB、カチオンF2-40Eなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸、ニューレックスTAB、ラビゾール80などのアニオン系界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステ

アレート（例えばノニオンST221）などの両性界面活性剤、その他三級アミンPB、ヘキサデシルジメチルアミンなど、イノシンからIMPへのリン酸化を促進する物であればいずれでも使用でき、これらは通常0.1~50mg/ml、好ましくは1~20mg/mlの濃度にて用いられる。また、有機溶剤としては、トルエン、キシレン、脂肪族アルコール、ベンゼン、酢酸エチルなどが用いられ、その濃度は0.1~50μl/ml、好ましくは1~20μl/mlが良い。

イノシンからIMPへのリン酸化を行う際のマグネシウムイオンの濃度は、4~400mMの範囲を保つことが望ましい。培養液もしくは固体などからリン酸化系に持ち込まれる量がこの濃度範囲を満たす場合は添加の必要はなく、一方、不足する場合は上記の濃度範囲に入るように添加する。マグネシウムイオンとしては無塩塩でも、有機酸の塩でも使用できる。

以下に、本発明の実施例を示す。

実施例1.

プレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21295 を、ポリペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, 酵母エキス 0.5%, 食塩 0.25%を含む種培地(pH7.2) 10mlを分注した50ml容大型試験管に一白金耳植菌し30℃で24時間往復振盪培養した。この種培養液を、グルコース 15%, カゼイン加水分解物 0.01%, 酵母エキス 0.7%, 硫酸 1.0%, KH_2PO_4 0.3%, K_2HPO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, アデニン、グアニン 各10μg/ml, ビオチン 10μg/lの組成の培地をpH7.2に調整後 300ml容バフフル付き三角フラスコに20mlずつ分注し、120℃、20分間蒸滅殺菌した培地に2ml植菌した。回転振盪培養にて30℃で培養中、必要に応じ尿素有添加することによって、pHを中性付近に保った。培養72時間目でイノシンが21.1mg/ml生成した。遠心分離によりイノシン菌体を除いた上清液を得た。

サッカロミセス・セレビシエ ATCC20018, トルロブシス・サイクロフィラ ATCC22163, キャンディダ・ゼイラノイデス ATCC20356 の3株を、

グルコース 30g/l, 硫酸アンモニウム 5g/l, KH_2PO_4 1g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, 酵母エキス 3g/l, CaCO_3 10g/l (殺菌前pH 6.5) の種培養培地300mlを含む2,000ml三角フラスコに植菌し、30℃にて24時間培養した種培養液を10% (容重比) の割合でグルコース 150g/l, 硫酸アンモニウム 10g/l, KH_2PO_4 1g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, コーンスティーブリカー 5g/l (殺菌前pH6.5) からなる固体生産培地 300mlを含む2 l三角フラスコに植菌し、培養期間中アンモニアにてpH6.5付近に調節しつつ、30℃にて48時間、回転振盪培養を行った。培養液から遠心分離により菌体を得た。

エシェリヒア・コリ C600 ATCC33525, 同じく B ATCC11303, スタフィロコッカス・オーレウス ATCC4012, セラチア・マルセッセンスYT 101 (FERM BP-1291) の各菌体を、上記と同じ組成の種培地(pH7.2) 10mlを分注・殺菌した大型試験管に一白金耳接種し、30℃にて20時間往復振盪培養した。これをM9培地(Na_2HPO_4 , 6mg/ml, KH_2PO_4 ,

3mg/ml, NaCl 5mg/ml, NH₄Cl 1mg/ml, サイアミン・HCl (4μg/ml, グルコース 3mg/ml, MgSO₄·7H₂O 0.25mg/ml, pH7.2)を300ml含む2ℓ三角フラスコ培地に2ml植菌し、30℃にて17時間回転振盪培養した。この培養液から菌体を遠心分離により集めた。

前記のプレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21295 株のイノシン発酵液上清に、ATP 再生活性を有するサッカロミセス・セレビスエ ATCC20018, トロブシス・サイクロフィラ ATCC 22163, キャンディダ・ゼイラノイダス ATCC20356, エシェリヒア・コリ C 6 0 0 ATCC33525, 同じく B ATCC11303, スタフィロコッカス・オーレウス ATCC4012の各菌株を、100mg/ml (湿菌体重量) となるように、またイノシンをIMPに転換する活性を有するセラチア・マルセッセンスYT101 (FERM BP-1291) の菌体を100mg/mlとなるように添加した。この菌体懸濁液に、グルコース 50mg/ml, 25%フィチン酸ソーダ (pH7.0) 8mg/ml, Na₂HPO₄ 5mg/ml, MgSO₄·7H₂O 5mg/mlを添加し、さらにナ

イミーンS-215 4mg/mlおよびキシレン10μl/ml (エシェリヒアおよびスタフィロコッカスの場合) または、三級アミンPB 1g/l (サッカロミセス、トロブシスおよびキャンディダの場合) を添加し、200mlビーカーに20mlずつ分注した。これをマグネチック・スターラーにて900rpmにて攪拌し、アンモニア水にてpHを7.4付近に調節しつつ、30℃にて24時間保ち、イノシンからIMPへのリン酸化反応を行った。結果を第1表に示す。

第 1 表

菌 株	IMP (mg/ml)
サッカロミセス・セレビスエ ATCC20018	5.70
トロブシス・サイクロフィラ ATCC22163	4.01
キャンディダ・ゼイラノイダス ATCC20356	4.30
エシェリヒア・コリ C600 ATCC33525	5.56
エシェリヒア・コリ B ATCC11303	6.82
スタフィロコッカス・オーレウス ATCC4012	3.35

実施例 2.

プレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21295 を、ポリペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, 酵母エキス 0.5%, 食塩 0.25%を含む種培地 (pH7.2) 10ml を分注した70ml容大型試験管に一白金耳植菌し30℃で24時間往復振盪培養した。これを、グルコース 15%, カゼイン加水分解物 0.01%, 酵母エキス 0.7%, 硫酸 1.0%, KH₂PO₄ 0.3%, K₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.5%, アデニン, グアニン各10μg/ml, ビオチン10μg/lの組成の培地をpH7.2に調整後 300ml容バフフル付き三角フラスコに20mlずつ分注し、120℃, 20分間蒸気殺菌した培地に2ml植菌した。回転振盪培養にて30℃で培養中、必要に応じて尿素を添加することによって、pHを中性付近に保った。培養76時間目でイノシンが20.0mg/ml生成した。

セラチア・マルセッセンスYT101 (FERM BP-1291) 株を、上記と同じ組成の種培地 (pH7.2) 10mlを分注・殺菌した大型試験管に一白金耳接種し、30℃にて20時間往復振盪培養した。これを、M9培地を

300ml含む2ℓ三角フラスコに2ml植菌し、30℃にて17時間回転振盪培養した。この培養液から菌体を遠心分離により集め、凍結保存 (-20℃) した。

セラチア・マルセッセンスYT101 (FERM BP-1291) の凍結菌体を水に懸濁し、湿菌体重量にて50mg/mlとなるようにイノシン発酵液に添加し、この液にグルコース50mg/ml, 25%フィチン酸ソーダ (pH 7.0) 8mg/ml, Na₂HPO₄ 5mg/ml, MgSO₄·7H₂O 5mg/mlとなるように添加し、さらにナイミーンS-215 4mg/ml、およびキシレン10μl/mlを添加し、200mlビーカーに20mlずつ分注した。これをマグネチック・スターラーにて900rpmにて攪拌し、アンモニア水にてpHを7.4付近に調節しつつ、30℃にて24時間保ち、イノシンからIMPへのリン酸化反応を行った。その結果、8.80mg/mlのIMP (以下IMP・Na₃·7H₂O相当量として表示、以下同じ) が生成蓄積した。なお、ナイミーンS-215 およびキシレンを添加しなかった場合は0.6mg/mlであった。また、セラチア・マルセッセンスの菌体を無添加の場合、IMPの蓄積量は

0.3mg/ml以下であった。

実施例3.

イノシン発酵菌として、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 19185 を用いたほかは実施例2と同様に培養・反応を行った。イノシン生成量は7.35mg/ml, IMP生成量は3.44mg/mlであった。

実施例4.

セラチア・マルセッセンスYT101(FERM BP-1291)の代わりに第2表に示す各菌株を用いる他は、実施例2と同様(A)またはイノシン発酵の培養液の遠心分離上清(B)を用いて反応を行った。第2表に結果を示す。なお、イノシンの生成量は18.9 mg/mlであった。

mlに濃縮(アミコン社製スタンダードセルモデル52に、アミコン社のダイヤフローメンブレンYM10を装着して使用)し、反応に用いた。

イノシン発酵液18mlに、セラチア・マルセッセンスの菌体抽出・濃縮液2mlを添加し、さらにグルコース、25%フィチン酸ソーダ(pH7.0)、 Na_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ をそれぞれ50、8、5、5 (mg/ml)となるように添加し、200mlビーカーに20mlずつ分注した。以下、実施例2と同様に反応を実施した。その結果、6.44mg/mlのIMPが生成した。

実施例6.

ブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21295 を実施例2と同様に培養し、イノシン19.3mg/mlと菌体を含有するイノシン発酵液を得た。また、セラチア・マルセッセンスYT101(FERM BP-1291)株を実施例2と同様に培養し、菌体を遠心分離により集めた。セラチア・マルセッセンスの菌体を、(1)蒸留水、(2)4%ナイミール溶液、(3)1%キシレン含有液、(4)4%ナイミール

第2表 各種細菌のイノシンリン酸化活性とIMP生産菌のATP再生活性との組み合わせによるIMP生産

菌 株		IMP (mg/ml)	
		(A)	(B)
エシェリヒア・コリ	ATCC 39023	3.21	0.22
エシェリヒア・コリ	ATCC 11303	2.33	0.18
バチルス・サチルス	ATCC 14617	2.29	0.21
フラクバクテリウム・デラウス	ATCC 10829	3.41	0.22

実施例5.

ブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21295 株を実施例2と同様に培養し、培養74時間にてイノシン18.3mg/mlを含有する発酵液を得た。一方、セラチア・マルセッセンスYT101(FERM BP-1291)を、同じく実施例2と同様に培養し、得られた菌体を遠心分離にて集菌した。該菌体をpH7.0のリン酸緩衝液に湿潤体量にて200mg/mlとなるように懸濁し、氷冷条件下で断続的に計10分間超音波破砕機(トミー精工社製、UR-200P型)にて細胞を破砕した。この細胞破砕液100mlを10,000rpm×10分間遠心分離した上清液を、分子篩膜にて10

ンおよび1%キシレンを含有する液、にそれぞれ懸濁し、湿潤菌体重量にて50mg/mlとなるように前記のイノシン発酵液に添加し、さらにグルコース50mg/ml、25%フィチン酸ソーダ(pH7.0) 8mg/ml、 Na_2HPO_4 5mg/ml、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg/mlとなるようにそれぞれ添加し、200mlビーカーに20mlずつ分注した。以下、実施例2と同様にIMP生成反応を実施した。結果を第3表に示す。

第3表 菌体処理方法

処理条件	IMP (mg/ml)
無処理	0.3
+ N	3.4
+ X	5.4
+ N + X	8.5

N: 4%ナイミールS-215

X: 1%キシレン

N + X: 4%ナイミール + 1%キシレン

発明の効果

イノシン生産菌がイノシン生産能と同時に有しているATP再生活性とATPとイノシンからIMPを生成する能力をもつ微生物のイノシンのリン酸化酵素活性とを共役させることにより、グルコースを主炭素源とし、ATPの代わりに安価なエネルギー供与体およびリン酸基供与体を用いてIMPを工業的に製造することができる。

特許出願人 (102) 協和醗酵工業株式会社

代表者 加 藤 幹 夫



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-233798

⑮ Int. Cl.⁴
C 12 P 19/32
C 12 N 15/00
// (C 12 P 19/32
C 12 R 1:19)

識別記号 庁内整理番号
Z-7236-4B
A-8412-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)9月29日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 5'-グアニル酸の製造法

⑯ 特 願 昭61-281589

⑰ 出 願 昭61(1986)11月26日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)10月9日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭61-240558

① 発 明 者	藤 尾	達 郎	神奈川県相模原市相模台6-29-1
② 発 明 者	丸 山	明 彦	神奈川県川崎市多摩区登戸3150
③ 発 明 者	西	達 也	東京都町田市中町3-9-11
④ 発 明 者	伊 藤	善 哉	神奈川県相模原市相原字八幡西218-14
⑤ 出 願 人	協和製薬工業株式会社		東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

5'-グアニル酸の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グアニル酸合成酵素遺伝子上流にP₁プロモーター遺伝子を保持するDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを用いて、温度感受性のcIリプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換して得られる形質転換株を培地で培養し、得られた培養液、菌体またはそれらの処理物を酵素源とし、5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸、およびアンモニアまたはグルタミンを基質として反応を行い、反応液中に5'-グアニル酸を蓄積せしめ、該反応液から5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

(2) グアニル酸合成酵素遺伝子上流にP₁プロモーター遺伝子を保持するDNA断片とベ

クターDNAとの組換え体DNAを用いて、温度感受性のcIリプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換して得られる形質転換株を、5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸およびアンモニアまたはグルタミンを含む培地で培養し、培養液中に5'-グアニル酸を蓄積せしめ、該培養液から5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は遺伝子の組換えDNA手法により5'-グアニル酸(以下GMPと称す)を製造する方法に関する。さらに詳細には、本発明は5'-キサンチル酸(以下XMPと称す)、アデノシン-三リン酸(以下ATPと称す)およびアンモニアまたはグルタミンからGMPを合成するグアニル酸合成酵素(別名:キサンチル酸アミナーゼ、以下GMPシンセターゼと称す)の遺伝子を含むDNA断片とベクターDNA断片との組換え体DNAを用い、微生物を形質転換